

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.11.005

邓小书, 徐金智, 谭发银, 等. 精氨酸调控人工培育冬虫夏草品质机制研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(11): 62-72.

# 精氨酸调控人工培育冬虫夏草品质机制研究

邓小书<sup>1,2</sup>, 徐金智<sup>1,2</sup>, 谭发银<sup>1,2</sup>, 罗昌树<sup>1,2</sup>, 王嘉<sup>1,2</sup>,  
郭连安<sup>1,2</sup>, 游华建<sup>1,2</sup>, 刘翔<sup>1,2</sup>, 陈仕江<sup>1,2</sup>

1. 重庆市中药研究院, 重庆 400065; 2. 重庆中医药学院, 重庆 璧山 402760

**摘要:** 分析人工培育冬虫夏草(*Ophiocordyceps sinensis*)品质变化的成因, 为提升人工培植冬虫夏草外观品质提供理论参考。以 5 龄感菌虫 MC、TMC(精氨酸处理), 僵虫 ST、TST(精氨酸处理), 子座长度 0~1 cm 的冬虫夏草 FB、TFB(精氨酸处理)为材料, 利用表型观察、细胞学分析、生理生化检测, 结果显示: 精氨酸处理影响了冬虫夏草的外观品质、活性氧代谢相关酶(PPO、SOD、POD、CAT)活性和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量变化, 且差异有统计学意义。利用转录组学揭示精氨酸对冬虫夏草品质的影响, 挖掘出了关键基因。在虫草发育过程中, TMC-vs-MC、TST-vs-ST、TFB-vs-FB 分别有 733 个基因(385 个上调、348 个下调)、815 个基因(435 个上调、380 个下调)和 158 个基因(95 个上调、63 个下调)表达量发生了显著变化, 其中, 162 个基因持续发生显著变化。这些差异表达基因主要富集在酪氨酸代谢通路(ko00350)、精氨酸和脯氨酸代谢通路(ko00330)、DNA 复制(ko03030)、色氨酸代谢通路(ko00380)、苯丙氨酸代谢通路(ko00360)、苯丙烷生物合成通路(ko00940)上。

**关键词:** 冬虫夏草; 精氨酸; 活性氧; 颜色变化

**中图分类号:** S567.35 **文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2025)11-0062-11

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## The Mechanism of Arginine Regulating the Quality of Artificially Cultivated *Ophiocordyceps sinensis*

DENG Xiaoshu<sup>1,2</sup>, XU Jinzhi<sup>1,2</sup>, TAN Fayin<sup>1,2</sup>,  
LUO Changshu<sup>1,2</sup>, WANG Jia<sup>1,2</sup>, GUO Lian'an<sup>1,2</sup>,  
YOU Huajian<sup>1,2</sup>, LIU Xiang<sup>1,2</sup>, CHEN Shijiang<sup>1,2</sup>

1. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China;

2. Chongqing University of Chinese Medicine, Bishan Chongqing 402760, China

收稿日期: 2025-04-28

基金项目: 重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2022NSCQ-MSX0874); 中国博士后科学基金面上项目(2023MD744143); 重庆市博士后基金项目(2023CQBSHTB3130); 重庆英才计划创新创业领军人才项目(CQYC20220301627); 重庆市基本科研业务费项目(cstc2023jxjl-jbkyX0002)。

作者简介: 邓小书, 博士, 副研究员, 主要从事中药资源可持续利用及开发研究。

通信作者: 陈仕江, 研究员。

**Abstract:** The objectives of this study is to analyze the underlying mechanism of quality changes in artificially cultivated *Ophiocordyceps sinensis* and provide a theoretical guidance for improving its appearance quality. Using arginine treated mycoparasite complex (MC, TMC), sclerotium (ST, TST), and fruiting body 0–1 cm (FB, TFB) of *O. sinensis* as experimental materials, phenotype observation, comparison of the histological structures, and physiological-biochemical indexes were conducted. The results showed that arginine treatment significantly affected the appearance quality of *O. sinensis*, with notable differences in the activities of reactive oxygen metabolism-related enzymes (PPO, SOD, POD, CAT) and changes in  $H_2O_2$  content. Additionally, RNA-seq was performed to reveal the impact of arginine on the quality of *O. sinensis* and identify the critical genes. During the development of *O. sinensis*, TMC-vs-MC, TST-vs-ST, and TFB-vs-FB showed significant changes in the expression of 733 genes (385 up-regulated, 348 down-regulated), 815 genes (435 up-regulated, 380 down-regulated), and 158 genes (95 up-regulated, 63 down-regulated), respectively. Among these, 162 genes exhibited consistently significant changes. KEGG enrichment analysis showed that those DE genes mainly enriched in the pathways of tyrosine metabolism (ko00350), arginine and proline metabolism (ko00330), DNA replication (ko03030), tryptophan metabolism (ko00380), Phenylalanine metabolism (ko00360), and Phenylpropanoid biosynthesis (ko00940).

**Key words:** *Ophiocordyceps sinensis*; arginine; reactive oxygen species; color change

冬虫夏草(*Ophiocordyceps sinensis*, 以下简称虫草)是名贵中药材, 具有独特的药用价值, 含多种活性成分, 如核苷、多糖、甾醇、蛋白质及氨基酸等, 备受消费者的青睐<sup>[1-3]</sup>。由于过度采挖, 天然冬虫夏草资源日渐匮乏, 市场上的需求缺口越来越大<sup>[4]</sup>。随着室内人工培植虫草技术的进步, 能培植并诱导出有子实体的虫草, 但在外观品质和商品规格等级上, 人工培植的虫草与天然虫草仍存在差异, 影响了人工培植虫草的商品价值<sup>[5-6]</sup>。

现有研究表明, 昆虫体色分为色素色和结构色<sup>[5-6]</sup>, 其中, 黑色素是昆虫体色多样性形成过程中至关重要的色素。黑色素通过酚氧化酶激活系统合成, 与先天免疫、硬化和色素沉积密切相关<sup>[7]</sup>。真菌颜色变化主要由褐变引起, 如食药菌双孢蘑菇、金针菇、猴头菌等, 其中, 酶促褐变起主导作用。酶促褐变形成的 3 个关键因素是底物(酚类物质)、酶和活性氧(ROS)<sup>[8-10]</sup>。张芳<sup>[11]</sup>的研究表明, 双孢蘑菇发生褐变主要是通过影响活性氧代谢及酚类物质代谢进行调控。本课题组前期利用组织细胞学、转录组学、蛋白组学等对人工培育虫草进行了品质机制研究, 发现虫草僵虫颜色变化与活性氧代谢、免疫耐受力代谢相关<sup>[12]</sup>, 精氨酸在虫草品质变化过程中起着重要作用<sup>[13]</sup>。龚佳惠等<sup>[14]</sup>研究发现, 0.1 mmol/L 精氨酸处理能够抑制绿芦笋丙二醛含量及木质素的生成, 提高了抗氧化能力, 维持了绿芦笋的品质; 1 mmol/L 精氨酸处理能够提高抗氧化系统活性, 提高了石榴果实的抗冷性, 延缓了果实冷害症状的发生<sup>[15]</sup>。用不同浓度的精氨酸处理白蘑菇研究发现, 精氨酸能够影响白蘑菇的贮藏品质<sup>[16]</sup>。精氨酸酶参与了茉莉酸甲酯调控的双孢蘑菇采后子实体的品质维持<sup>[17]</sup>。对番茄不同成熟期果实内源精氨酸代谢的研究发现, 精氨酸在果实成熟过程中具有独特的生理作用<sup>[18]</sup>。大量研究表明, 精氨酸对改善品质具有重要作用。

本研究通过精氨酸处理不同发育时期的虫草, 利用苏木精—伊红染色法(HE)结合光学显微镜观察组织细胞学变化, 采用试剂盒检测不同发育时期样本的丙二醛(MDA)、过氧化氢( $H_2O_2$ )含量以及多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性变化; 通过 Illumina 测序平台对 3 个时期的冬虫夏草进行转录组测序分析, 挖掘与颜色变化相关的关键基因, 并从活性氧代谢角度分析精氨酸在调控虫草品质中的功能, 旨在为进一步解析虫草虫体颜色变化的成因奠定分子学基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 供试材料

5 龄感菌虫(MC)、僵虫(ST)、子座长度 0~1 cm 冬虫夏草(FB), 由重庆市中药研究院冬虫夏草研究

所实验室人工培植提供, 饲养温度为  $(8 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 湿度为  $50\% \pm 5\%$ , 无光照。选取虫体大小、颜色、发育时期均一致的样本, 采用  $10\text{ mmol/L}$  精氨酸溶液<sup>[16]</sup> 浸泡处理 MC、ST、FB 30 min, 处理后 5 龄感菌虫 (TMC)、僵虫 (TST) 与 MC、ST 一起培养 1 个月, 子座长度  $0 \sim 1\text{ cm}$  冬虫夏草 (TFB) 与 FB 培养至采收期。常规人工培植冬虫夏草在人工模拟天然冬虫夏草产区环境进行培植。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 组织细胞学鉴定

取不同发育时期样本[5 龄感菌虫 (MC、TMC)、僵虫 (ST、TST)、子座长度  $0 \sim 1\text{ cm}$  冬虫夏草 (FB、TFB)] 于  $2\%$  戊二醛固定液中固定 24 h, 经梯度酒精 ( $70\%$ 、 $75\%$ 、 $85\%$ 、 $90\%$  和  $100\%$  酒精各 30 min) 脱水, 再放入酒精与二甲苯混合液 (体积比  $1:1$ ) 中浸泡 15 min, 随后放入二甲苯中浸泡 30 min。待样品完全透明后, 将其放入二甲苯与石蜡混合液中浸泡 10 min, 最后放入软蜡和硬蜡中各 30 min, 冷却凝固。将石蜡包埋的样品经石蜡切片机进行切片, 每个组织切片厚度为  $5 \sim 7\ \mu\text{m}$ , 放于载玻片制片,  $37^\circ\text{C}$  过夜烤片, HE 染色, 树脂封片, 光学显微镜下观察样品的组织细胞学结构并拍照。

### 1.2.2 待测液提取

将  $-80^\circ\text{C}$  保存的待测组织置于已用液氮预冷过的研钵中, 加入液氮研磨成粉, 准确称取  $0.1\text{ g}$  粉末, 加入  $900\ \mu\text{L}$  PBS 缓冲液进行匀浆,  $8\ 500\ \text{r/min}$   $4^\circ\text{C}$  离心 10 min, 取上清液用于酶活性及相关含量分析, 置冰上待测。

### 1.2.3 活性氧代谢、MDA 及 $\text{H}_2\text{O}_2$ 含量测定

多酚氧化酶 (PPO) 试剂盒 (微量法, PPO-1-Y)、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (NBT 法, SOD-1-Y)、过氧化氢酶 (CAT) 试剂盒 (钼酸铵比色法, CAT-1-W)、过氧化物酶 (POD) 试剂盒 (微量法, POD-1-Y)、丙二醛 (MDA) 试剂盒 (微量法, MDA-1-Y) 及过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 试剂盒 (微量法,  $\text{H}_2\text{O}_2$ -1-Y), 参照说明书进行检测, 由苏州科铭生物技术有限公司提供。

### 1.2.4 Total RNA 提取与高通量测序

Total RNA 提取采用 mirVana<sup>TM</sup> miRNA Isolation Kit 试剂盒 (Ambion, 美国), 检测 RNA 样品的纯度、浓度和完整性, 按照 TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit 试剂盒操作说明书进行 cDNA 文库构建, 使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 生物分析仪进行质检, 质检合格后于 Illumina HiSeq<sup>TM</sup> 2500 高通量测序平台对文库进行测序。

### 1.2.5 序列筛选与组装

转录组测序后产生的原始数据 (Raw reads) 使用 Trimmomatic 软件进行质控并去除接头, 在此基础上过滤掉低质量碱基以及 N 碱基, 最终得到高质量的 Clean reads。将 Clean reads 使用 hisat2 比对到物种的参考基因组, 冬虫夏草菌参考基因组来源于 NCBI 数据库 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA\\_000448365.1/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_000448365.1/)), 软件参数为默认参数, 通过基因组比对率评估样本的情况。

### 1.2.6 Unigene 功能注释和分类

对得到的 Unigene 进行基因功能注释, 利用 GO (基因本体论数据库, <http://geneontology.org/>) 和 KEGG (京都基因与基因组百科全书数据库, <http://www.kegg.jp/>) 进行 GO 分类和注释、KEGG 代谢通路分析, 进而获得所有 Unigene 的功能注释信息。

### 1.2.7 差异表达基因的筛选

利用 DESeq 软件对差异表达基因进行分析, 结合 Benjamini-Hochberg 方法对原有假设检验得到的显著性  $p$  值进行校正,  $p < 0.05$  为差异表达基因筛选的关键指标。以错误发现率  $FDR < 0.05$  且  $|\log_2 FC| > 1$  (Fold Change, FC) 作为筛选标准, 并对筛选到的差异表达基因进行 GO 富集及 KEGG 通路富集分析。

### 1.2.8 qRT-PCR 分析

为了验证转录组数据的可靠性, 采用真菌 18 S 核糖体 RNA 作为内参基因, 随机选取 6 个差异表达基因进行 qRT-PCR 验证, 设计 qRT-PCR 特异引物 (表 1), 利用反转录试剂盒 HiScript<sup>®</sup> II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Vazyme, 中国) 将 RNA 反转录得到 cDNA, 采用 SYBR Green Master Mix 荧光定量

试剂盒 (Vazyme, 中国) 在荧光定量 PCR 仪上进行定量检测, 每个样品 3 个重复, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算差异基因的相对表达量<sup>[19]</sup>。

表 1 qRT-PCR 引物

| 基因 ID          | 基因名称         | 正向引物(5'→3')               |
|----------------|--------------|---------------------------|
| G6O67_000058-F | <i>rnr-2</i> | ATCCTCAGCGATTTGTTCTATTCC  |
| G6O67_000058-R |              | AGGCGGTTGTTCCAGTCGTG      |
| G6O67_006145-F | <i>kaiG</i>  | AGCCCACGATGCTGACGACG      |
| G6O67_006145-R |              | GCGGTGCGTTAGCTTGAACCAG    |
| G6O67_002978-F | <i>fdh</i>   | CGGCGAGGCTGCCAAAGATA      |
| G6O67_002978-R |              | CGGGATGGAAGGGAGTTGTGAT    |
| G6O67_002549-F | <i>mph1</i>  | CGAAGACGGCAGAGCGAGGAGGAT  |
| G6O67_002549-R |              | TGGAAGCGGCGTTGCCACTAA     |
| G6O67_003360-F | <i>ustF1</i> | AGCGGAAAGGACGCAAAGGG      |
| G6O67_003360-R |              | TGTCGGAGCGGGAAAGCACA      |
| G6O67_006406-F | <i>tpx1</i>  | CGGCGAGTTCAAGGACGTTTCC    |
| G6O67_006406-R |              | CGTTGTACTGGATGATTTCCGTGGG |
| 18S-F          | 内参基因         | AGATTCAAAGCCAATGCCCC      |
| 18S-R          |              | TGGCCACTACCCAAACATCG      |

### 1.3 数据分析

采用 Excel 2020 进行数据整理, 运用 GraphPad Prism 软件对数据进行显著性分析与作图。统计分析采用  $t$  检验, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同发育时期组织细胞学分析

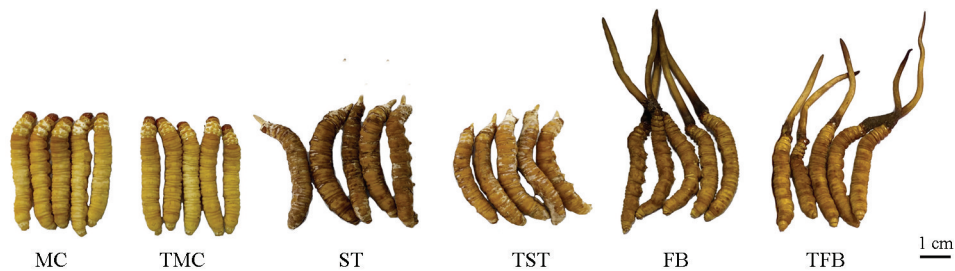
为明确精氨酸在虫草发育过程中如何影响品质, 本研究对不同发育时期虫草进行虫体表型鉴定和组织细胞学分析。图 1a 显示, 与 MC 和 FB 相比, TMC 和 TFB 虫体颜色无明显变化; 与 ST 相比, TST 虫体颜色更优。对各组织样本纵切, 经 HE 染色后发现, 与 MC 相比, TMC 的组织细胞密度变小、组织结构更加紧凑(图 1b、1c); 与 ST 相比, TST 的组织细胞密度也变小、组织结构也更加紧凑(图 1d、1e)。虫草生长后期, 与 FB 相比, TFB 无明显变化(图 1f、1g)。由此表明, 虫草生长发育前期易受精氨酸胁迫, 影响了虫体浅表层的细胞结构。

### 2.2 不同发育时期虫草活性氧代谢相关酶活性、MDA 及 $H_2O_2$ 含量变化

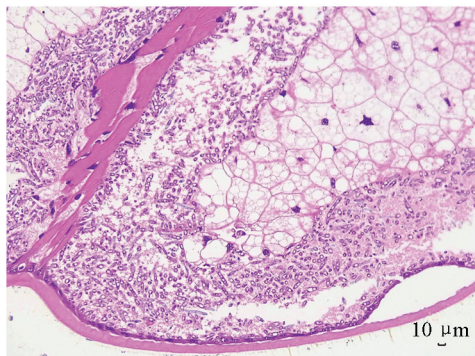
对各组织样本体内活性氧代谢相关酶(PPO、SOD、CAT、POD)活性、MDA 和  $H_2O_2$  含量进行检测, 结果表明(图 2), 在虫草发育前期, 与对照相比, TMC 和 TST 的 PPO、POD、CAT 活性显著增加( $p < 0.01$ ), SOD 酶活性显著降低( $p < 0.01$ ); 在发育后期, 与对照相比, TFB 的 PPO( $p < 0.01$ )、POD( $p < 0.05$ )活性显著降低, SOD 活性显著增加( $p < 0.01$ ), CAT 活性无明显变化。整个发育周期中, 精氨酸处理前后 MDA 含量较对照有所减少, 但变化不明显(图 2e)。与对照相比, TMC 和 TST 的  $H_2O_2$  含量显著降低( $p < 0.01$ ), TFB 的  $H_2O_2$  含量显著增加( $p < 0.01$ , 图 2f)。综合表明, 精氨酸处理不同发育时期的虫草后, 活性氧代谢相关酶(PPO、SOD、POD、CAT)活性和  $H_2O_2$  含量变化差异有统计学意义。

### 2.3 转录组测序质量分析

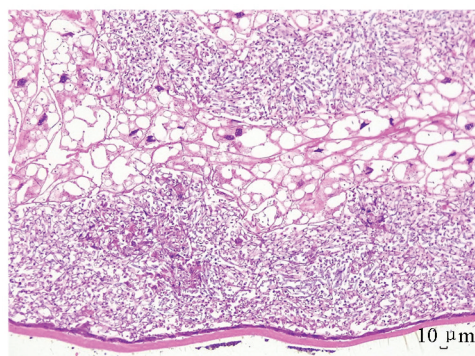
为探究精氨酸调控虫草品质的关键基因, 本研究利用 RNA-seq 技术对虫草 3 个发育时期(MC: 5 龄感菌虫; TMC: 精氨酸处理的 5 龄感菌虫。ST: 僵虫; TST: 精氨酸处理的僵虫。FB: 子座长度 0~1 cm



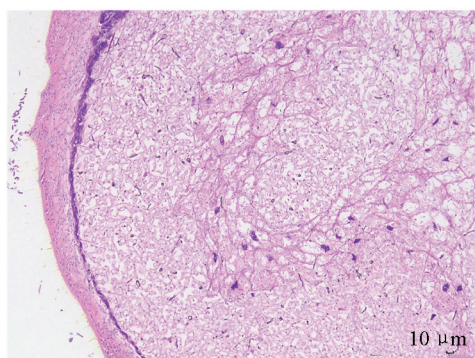
a. 不同发育时期虫草表型变化



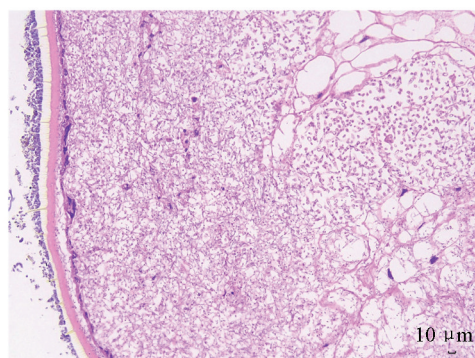
b. MC虫体浅表层细胞切片观察



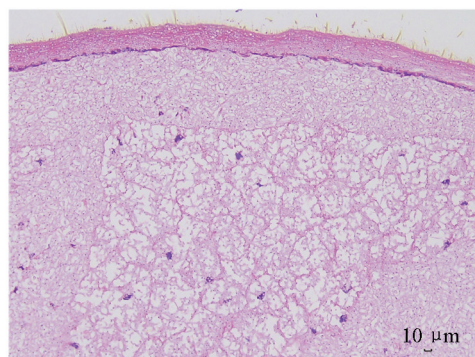
c. TMC虫体浅表层细胞切片观察



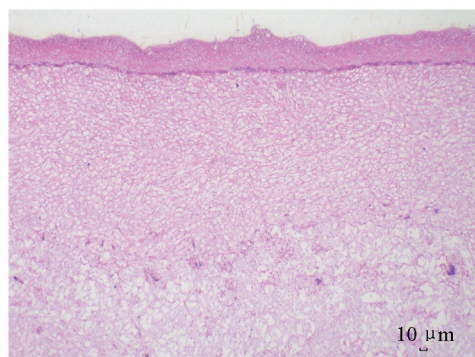
d. ST虫体浅表层细胞切片观察



e. TST虫体浅表层细胞切片观察



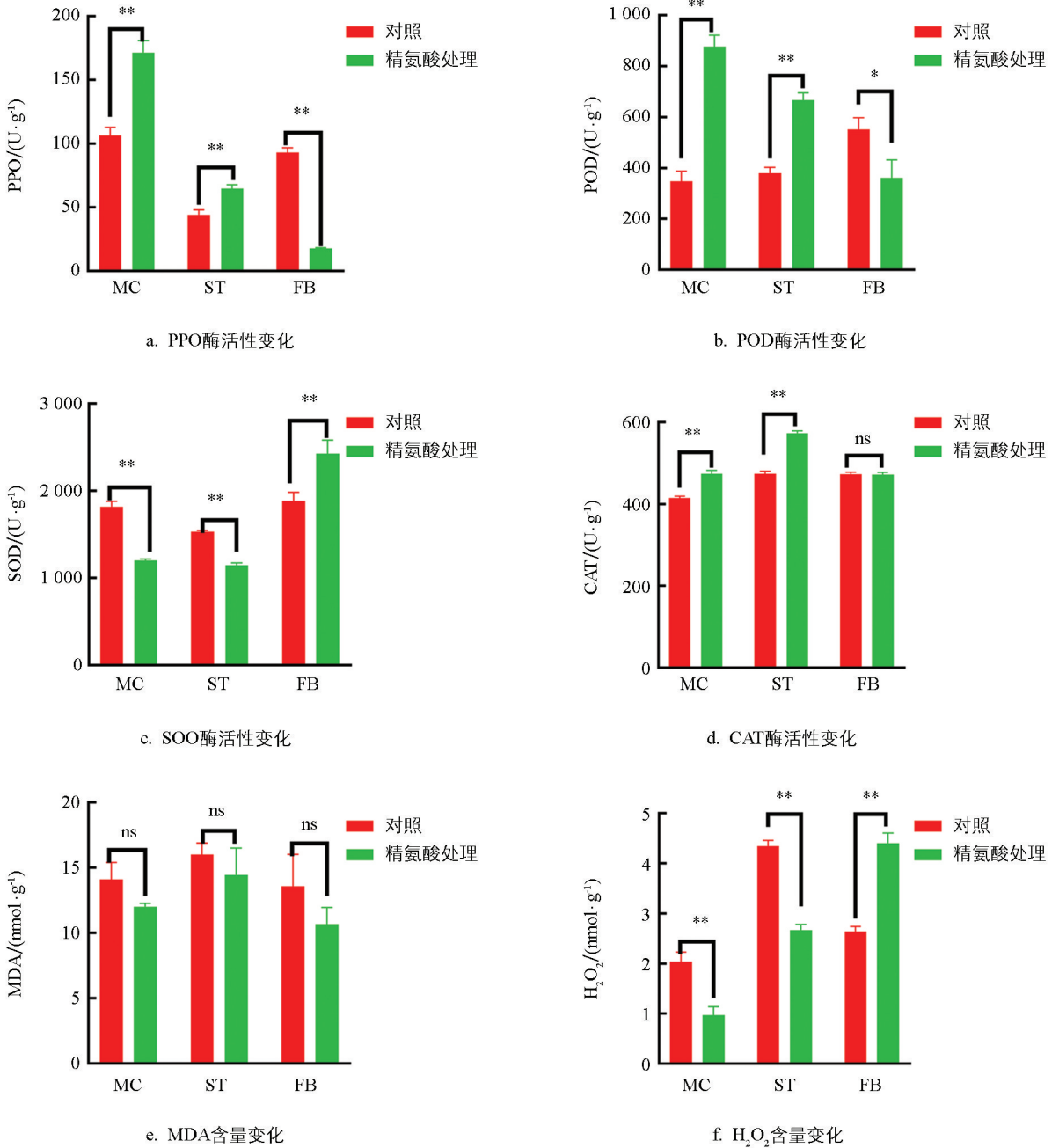
f. FB虫体浅表层细胞切片观察



g. TFB虫体浅表层细胞切片观察

图 1 不同发育时期虫草表型变化和细胞特性

冬虫夏草; TFB: 精氨酸处理的子座长度 0~1 cm 冬虫夏草) 样本进行了分析, 如表 2。测序总计得到  $8.9442 \times 10^8$  Raw reads, 经质量筛选后, 得到  $8.6369 \times 10^8$  Clean reads, 共计  $1.2535 \times 10^{11}$  Clean bases, 各样本的有效数据量为  $(6.88 \sim 7.07) \times 10^9$ , Q30 碱基为 95.15%~96.61%, 平均 GC 为 54.50% (表 2)。从测序产出数据质量评估结果可知, 本次测序数据饱和度较高, 可以满足后期的数据分析。



\* 表示  $p < 0.05$ , \*\* 表示  $p < 0.01$ , 差异有统计学意义; ns 表示差异无统计学意义。

图 2 活性代谢相关酶活性、MDA 及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量变化

表 2 转录组测序数据质量统计情况

| 样本   | Raw reads           | Clean reads         | Raw bases          | Clean bases        | Q30/% | GC/%  |
|------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-------|-------|
| MC1  | $4.988 \times 10^7$ | $4.846 \times 10^7$ | $7.28 \times 10^9$ | $7.07 \times 10^9$ | 96.60 | 45.52 |
| MC2  | $4.937 \times 10^7$ | $4.795 \times 10^7$ | $7.20 \times 10^9$ | $7.00 \times 10^9$ | 96.54 | 45.37 |
| MC3  | $4.951 \times 10^7$ | $4.779 \times 10^7$ | $7.18 \times 10^9$ | $6.93 \times 10^9$ | 96.61 | 45.42 |
| TMC1 | $4.977 \times 10^7$ | $4.811 \times 10^7$ | $7.23 \times 10^9$ | $6.99 \times 10^9$ | 96.54 | 45.11 |
| TMC2 | $4.889 \times 10^7$ | $4.741 \times 10^7$ | $7.12 \times 10^9$ | $6.91 \times 10^9$ | 96.47 | 45.03 |

续表 2

| 样本   | Raw reads             | Clean reads           | Raw bases          | Clean bases              | Q30/% | GC/%  |
|------|-----------------------|-----------------------|--------------------|--------------------------|-------|-------|
| TMC3 | $5.003 \times 10^7$   | $4.838 \times 10^7$   | $7.27 \times 10^9$ | $7.03 \times 10^9$       | 95.37 | 45.42 |
| ST1  | $4.941 \times 10^7$   | $4.767 \times 10^7$   | $7.17 \times 10^9$ | $6.91 \times 10^9$       | 95.72 | 58.82 |
| ST2  | $4.871 \times 10^7$   | $4.727 \times 10^7$   | $7.10 \times 10^9$ | $6.89 \times 10^9$       | 95.38 | 58.84 |
| ST3  | $4.953 \times 10^7$   | $4.762 \times 10^7$   | $7.16 \times 10^9$ | $6.88 \times 10^9$       | 95.93 | 58.75 |
| TST1 | $4.936 \times 10^7$   | $4.760 \times 10^7$   | $7.15 \times 10^9$ | $6.90 \times 10^9$       | 95.66 | 59.62 |
| TST2 | $5.010 \times 10^7$   | $4.827 \times 10^7$   | $7.26 \times 10^9$ | $6.99 \times 10^9$       | 95.94 | 59.49 |
| TST3 | $4.981 \times 10^7$   | $4.789 \times 10^7$   | $7.20 \times 10^9$ | $6.93 \times 10^9$       | 95.97 | 59.59 |
| FB1  | $4.944 \times 10^7$   | $4.781 \times 10^7$   | $7.19 \times 10^9$ | $6.95 \times 10^9$       | 95.76 | 59.29 |
| FB2  | $4.940 \times 10^7$   | $4.773 \times 10^7$   | $7.18 \times 10^9$ | $6.93 \times 10^9$       | 95.15 | 59.29 |
| FB3  | $5.021 \times 10^7$   | $4.846 \times 10^7$   | $7.29 \times 10^9$ | $7.03 \times 10^9$       | 95.86 | 59.28 |
| TFB1 | $5.015 \times 10^7$   | $4.832 \times 10^7$   | $7.27 \times 10^9$ | $7.00 \times 10^9$       | 95.79 | 58.65 |
| TFB2 | $5.077 \times 10^7$   | $4.882 \times 10^7$   | $7.34 \times 10^9$ | $7.06 \times 10^9$       | 96.03 | 58.74 |
| TFB3 | $5.008 \times 10^7$   | $4.813 \times 10^7$   | $7.23 \times 10^9$ | $6.95 \times 10^9$       | 96.23 | 58.78 |
| 总和   | $8.944 2 \times 10^8$ | $8.636 9 \times 10^8$ | /                  | $1.253 5 \times 10^{11}$ | /     | /     |

## 2.4 差异表达基因分析

差异表达基因筛选结果如图 3, 由柱状图、差异表达韦恩(Venn)图展示差异基因数目, TMC-vs-MC 共有 733 个基因表达量发生了显著变化, 其中上调表达的基因有 385 个, 下调表达的基因有 348 个; TST-vs-ST 共有 815 个基因表达量发生了显著变化, 其中上调表达的基因有 435 个, 下调表达的基因有 380 个; TFB-vs-FB 共有 158 个基因表达量发生了显著变化, 其中上调表达的基因有 95 个, 下调表达的基因有 63 个。在这些基因中, 总共有 162 个基因持续地发生显著变化。由此表明, 采用精氨酸处理前期虫草, 对其生长发育的影响较大; 后期采用精氨酸处理, 差异表达基因数量显著减少, 表明精氨酸对虫草生长发育后期影响较小。

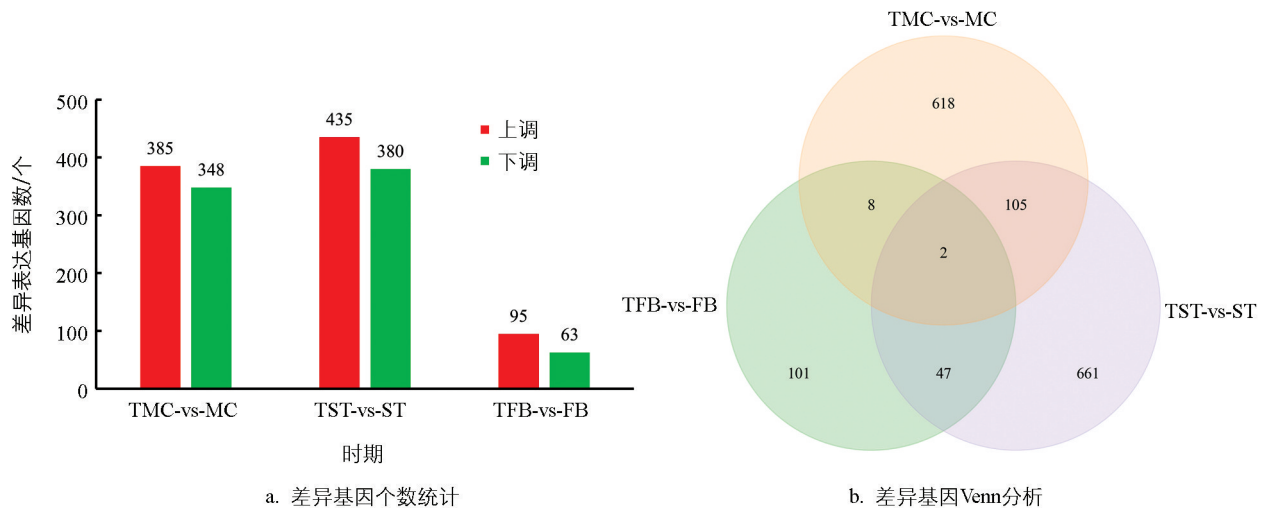


图 3 差异表达基因筛选

## 2.5 差异表达基因 KEGG 富集分析

KEGG 富集分析发现(图 4), 这些差异表达基因主要富集在酪氨酸代谢通路(Tyrosine metabolism,

ko00350)、精氨酸和脯氨酸代谢通路(Arginine and proline metabolism, ko00330)、DNA 复制(DNA replication, ko03030)、色氨酸代谢通路(Tryptophan metabolism, ko00380)、苯丙氨酸代谢通路(Phenylalanine metabolism, ko00360)、苯丙烷生物合成通路(Phenylpropanoid biosynthesis, ko00940)上。

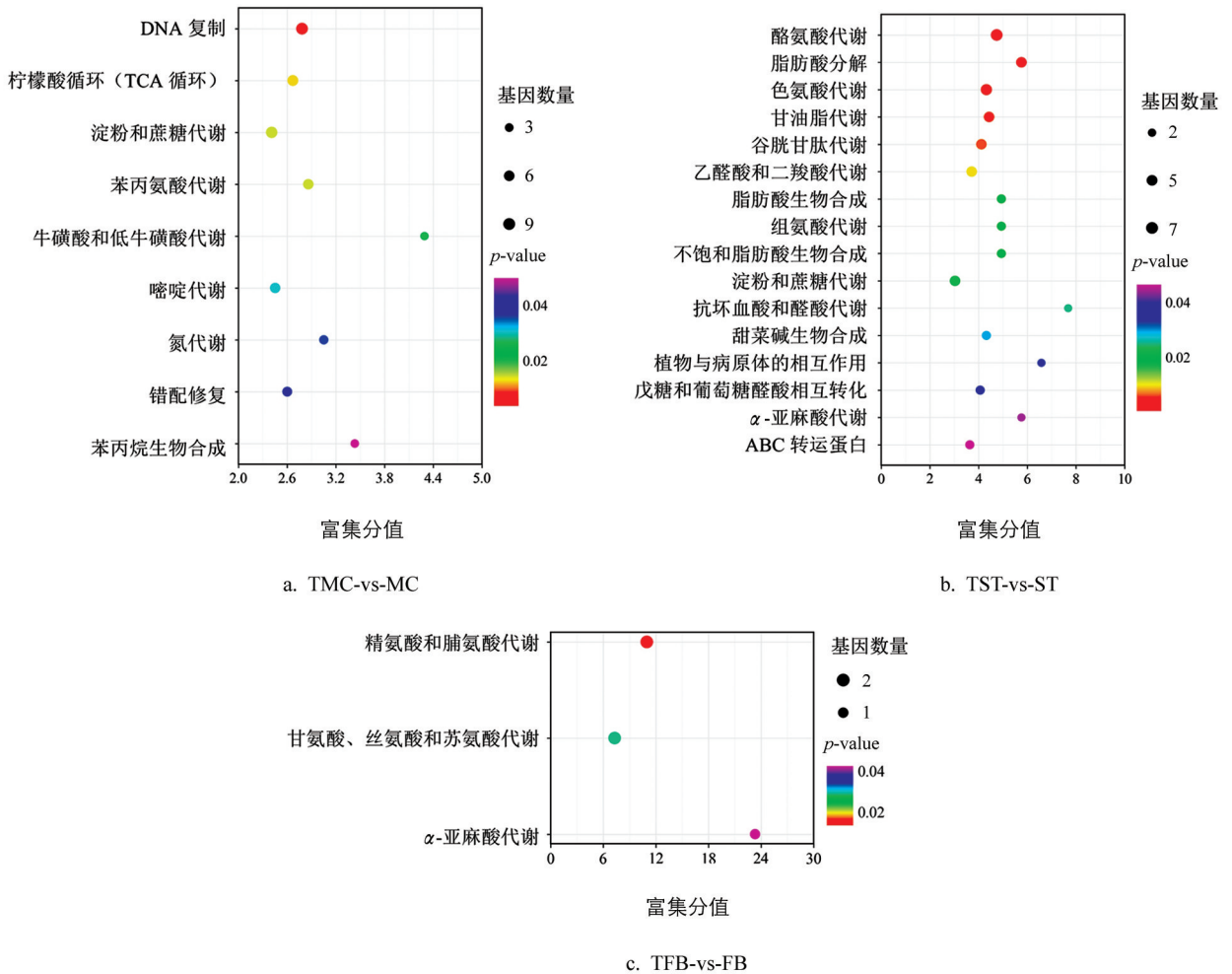


图 4 差异表达基因 KEGG 富集分析

## 2.6 冬虫夏草品质调控关键基因挖掘

昆虫和食药菌颜色变化主要由过氧化物酶、酚氧化酶、活性氧、黑化反应等调控<sup>[20-22]</sup>。由图 5 可知,丝/苏氨酸蛋白激酶 G6O67\_002549(Serine/threonine-protein kinase, *mph1*), 过氧化氢酶 G6O67\_006145(Catalase-peroxidase, *katG*), 核糖核苷二磷酸还原酶 G6O67\_000058(Ribonucleoside-diphosphate reductase, *rnr-2*), 丝/苏氨酸蛋白激酶 G6O67\_000008(Serine/threonine-protein kinase, *SAT4*), 甲酸脱氢酶 G6O67\_002978(Formate dehydrogenase, *fdh*)在 TMC-vs-MC 和 TST-vs-ST 中表达显著上调, 在 TFB-vs-FB 中表达下调; 在整个发育周期 G6O67\_003360(*ustF1*)均表达下调。其中, 有 3 个差异表达基因能显著富集到 KEGG 通路中, 分别是过氧化氢酶 *katG*、核糖核苷二磷酸还原酶 *rnr-2*、甲酸脱氢酶 *fdh*。值得关注的是, 过氧化氢酶 *katG* 表达变化趋势与 CAT 酶活性变化相一致。

## 2.7 qRT-PCR 验证

为了验证转录组数据的准确性, 随机挑选 6 个差异表达基因进行 qRT-PCR 验证, 结果显示这 6 个基因表达水平与转录组数据的变化趋势相一致(图 6), 由此表明, 转录组测序数据可靠。

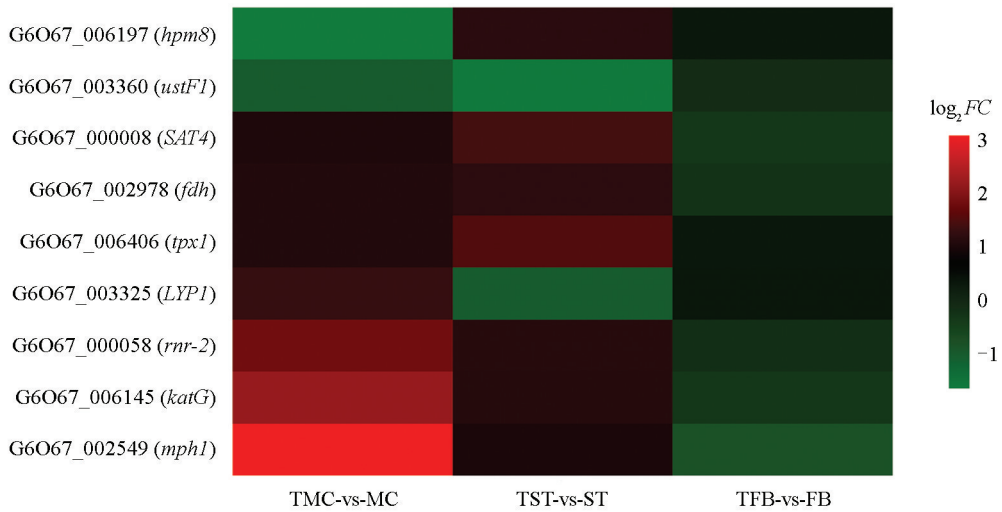


图 5 颜色变化相关差异表达基因

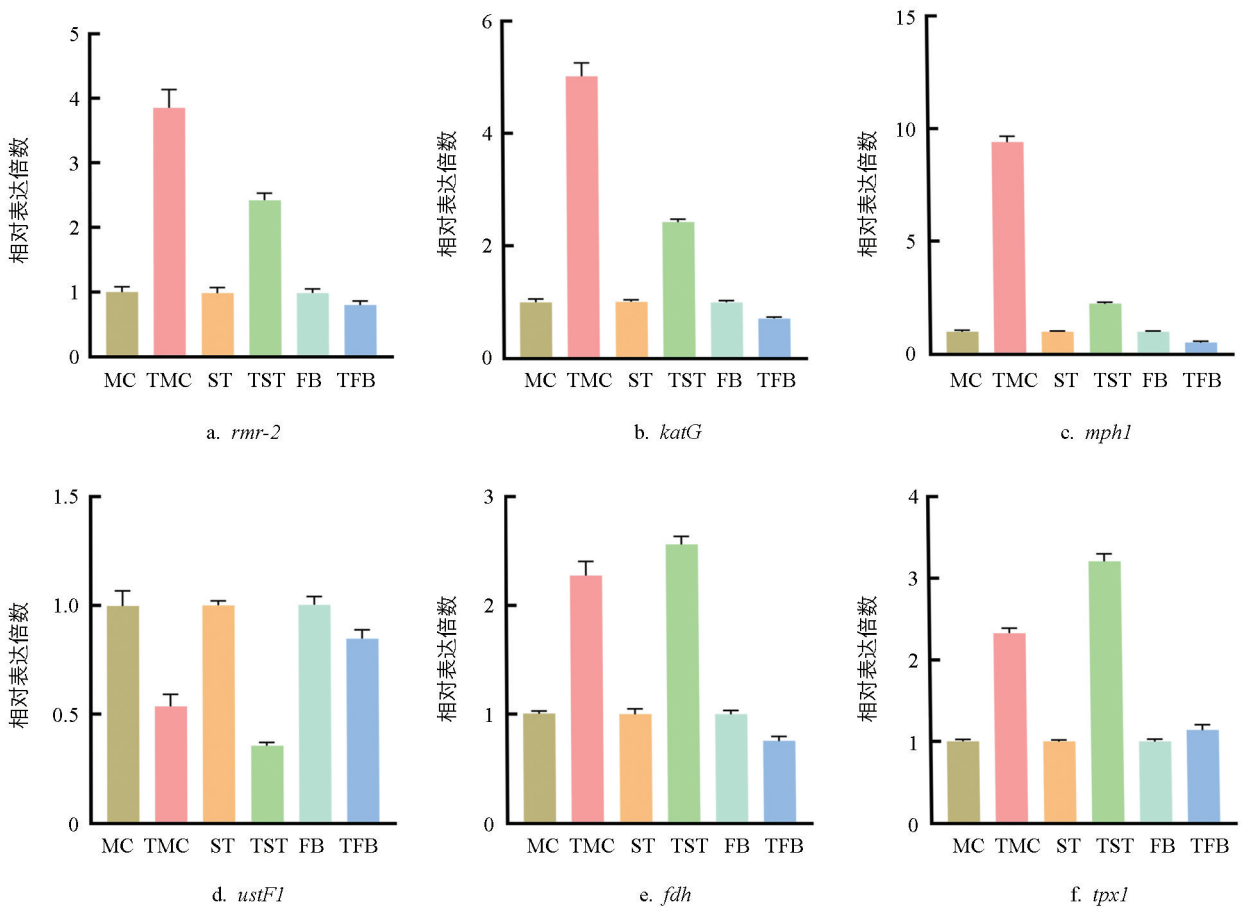


图 6 qRT-PCR 验证结果

### 3 讨论与结论

#### 3.1 讨论

为明确人工培育的虫草颜色变化品质机制, 本研究对精氨酸处理不同发育时期虫草的表型及细胞学特征进行了分析。结果表明, 精氨酸通过调控活性氧代谢相关酶活性(尤其是过氧化氢酶), 进而影响虫草虫体颜色的变化。经查阅文献资料发现, 无论是探究昆虫颜色变化, 还是探究食药菌颜色变化涉及的酶促褐变, 都与活性氧代谢密切相关<sup>[22-25]</sup>。

差异表达基因筛选分析发现, TMC-vs-MC 共有 733 个基因、TST-vs-ST 共有 815 个、TFB-vs-FB 共有 158 个基因表达量发生了显著变化, 其中, 162 个基因持续发生显著变化。这些差异表达基因主要富集在酪氨酸代谢通路(ko00350)、精氨酸和脯氨酸代谢通路(ko00330)、DNA 复制(ko03030)、色氨酸代谢通路(ko00380)、苯丙氨酸代谢通路(ko00360)、苯丙烷生物合成通路(ko00940)上。研究表明, 酪氨酸代谢通路、苯丙氨酸代谢通路、精氨酸和脯氨酸代谢通路、苯丙烷生物合成通路相关基因可能参与了虫草发育过程中虫体颜色的变化, 这与前人报道相一致。例如, 酪氨酸酶是黑色、白色、黄色 3 种色素前体物质合成过程中的关键限速酶, 酪氨酸酶活性或其基因表达受影响时, 会造成底物大量积累并沿着某一色素合成方向进行反应<sup>[26-27]</sup>。鳞翅目昆虫家蚕已有多与黑色素合成信号通路、苯丙氨酸代谢通路、苯丙烷生物合成通路相关功能基因被报道, 如 TH(酪氨酸羟化酶)<sup>[28]</sup>、DDC(多巴脱羧酶)<sup>[29]</sup>、yellow/laccase2(漆酶)<sup>[30]</sup>等。此外, 精氨酸不仅能保持蓝莓的品质, 还能激活其抗氧化系统<sup>[31]</sup>。精氨酸能有效抑制柑橘的酶促褐变<sup>[32]</sup>, 还能抑制刚切开的苹果和生菜的褐变<sup>[33]</sup>。本研究中筛选到 1 个过氧化氢酶基因 *katG*, 该基因能显著富集到苯丙氨酸代谢通路、苯丙烷生物合成通路上, 这些代谢通路都与褐变、活性氧、黑化等过程密切相关<sup>[22-25]</sup>。由此表明, 精氨酸处理虫草后, 通过调控过氧化氢酶活性或过氧化氢酶基因的表达, 进而激活抗氧化系统, 调节虫草颜色的变化。

### 3.2 结论

精氨酸处理不同发育时期的虫草, 活性氧代谢相关酶(PPO、SOD、POD、CAT)活性和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量变化差异有统计学意义。在虫草发育过程中, TMC-vs-MC 总共有 733 个、TST-vs-ST 共有 815 个、TFB-vs-FB 共有 158 个基因表达量发生了显著变化, 其中, 162 个基因持续发生显著变化。这些差异表达基因主要富集在酪氨酸代谢通路、苯丙氨酸代谢通路、精氨酸和脯氨酸代谢通路、色氨酸代谢通路、DNA 复制、苯丙烷生物合成通路上。过氧化氢酶基因 *katG* 表达变化趋势与 CAT 酶活性变化相一致。

### 参考文献:

- [1] ZHAO J, XIE J, WANG L Y, et al. Advanced Development in Chemical Analysis of Cordyceps [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 87(1): 271-289.
- [2] 钱正明, 李文庆, 孙敏甜, 等. 冬虫夏草化学成分分析 [J]. 菌物学报, 2016, 35(4): 476-490.
- [3] YUE K, YE M, ZHOU Z J, et al. The Genus Cordyceps: A Chemical and Pharmacological Review [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2013, 65(4): 474-493.
- [4] WEI Y Q, ZHANG L, WANG J N, et al. Chinese Caterpillar Fungus (*Ophiocordyceps sinensis*) in China: Current Distribution, Trading, and Futures under Climate Change and Overexploitation [J]. Science of the Total Environment, 2021, 755(1): 142548.
- [5] SHAMIM G, RANJAN S K, PANDEY D M, et al. Biochemistry and Biosynthesis of Insect Pigments [J]. European Journal of Entomology, 2014, 111(2): 149-164.
- [6] 高云, 梁燕婷, 留怡勤, 等. 昆虫着色及体表黑色斑纹和斑点形成机制研究进展 [J]. 昆虫学报, 2020, 63(10): 1268-1275.
- [7] ZHAN S, GUO Q H, LI M H, et al. Disruption of an N-Acetyltransferase Gene in the Silkworm Reveals a Novel Role in Pigmentation [J]. Development, 2010, 137(23): 4083-4090.
- [8] DOKHANIEH A Y, AGHDAM M S. Postharvest Browning Alleviation of *Agaricus bisporus* Using Salicylic Acid Treatment [J]. Scientia Horticulturae, 2016, 207: 146-151.
- [9] MAGAE Y, SUNAGAWA M. Characterization of a Mycovirus Associated with the Brown Discoloration of Edible Mushroom, *Flammulina velutipes* [J]. Virology Journal, 2010, 7(342): 1-8.
- [10] KIM S. Antioxidant Compounds for the Inhibition of Enzymatic Browning by Polyphenol Oxidases in the Fruiting Body Extract of the Edible Mushroom *Hericium erinaceus* [J]. Foods, 2020, 9(7): 951-961.
- [11] 张芳. 影响双孢蘑菇褐变代谢机制研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [12] 邓小书, 卫秋阳, 贺元川, 等. 人工增殖冬虫夏草僵虫颜色变化初探 [J]. 应用昆虫学报, 2021, 58(6): 1339-1346.
- [13] 重庆市中药研究院. 精氨酸在调控冬虫夏草褐变中的应用及培养处置方法: 202110954657.1 [P]. 2023-01-13.

- [14] 龚佳惠, 陈贝莉, 董欢欢, 等. L-精氨酸对绿芦笋贮藏品质及生理生化特性的影响 [J]. 保鲜与加工, 2017, 17(1): 7-11.
- [15] BABALAR M, PIRZAD F, ALI ASKARI SARCHESHMEH M, et al. Arginine Treatment Attenuates Chilling Injury of Pomegranate Fruit during Cold Storage by Enhancing Antioxidant System Activity [J]. Postharvest Biology and Technology, 2018, 137: 31-37.
- [16] LI B B, DING Y, TANG X L, et al. Effect of L-Arginine on Maintaining Storage Quality of the White Button Mushroom (*Agaricus bisporus*) [J]. Food and Bioprocess Technology, 2019, 12(4): 563-574.
- [17] MENG D M, ZHANG Y X, YANG R, et al. Arginase Participates in the Methyl Jasmonate-Regulated Quality Maintenance of Postharvest *Agaricus bisporus* Fruit Bodies [J]. Postharvest Biology and Technology, 2017, 132: 7-14.
- [18] ZHANG X H, JI N N, ZHEN F H, et al. Metabolism of Endogenous Arginine in Tomato Fruit Harvested at Different Ripening Stages [J]. Scientia Horticulturae, 2014, 179: 349-355.
- [19] VARKONYI-GASIC E, WU R M, WOOD M, et al. Protocol: A Highly Sensitive RT-PCR Method for Detection and Quantification of MicroRNAs [J]. Plant Methods, 2007, 3: 12.
- [20] MOON K M, KWON E B, LEE B, et al. Recent Trends in Controlling the Enzymatic Browning of Fruit and Vegetable Products [J]. Molecules, 2020, 25(12): 2754.
- [21] KHETTAL B, KADRI N, TIGHILET K, et al. Phenolic Compounds from Citrus Leaves: Antioxidant Activity and Enzymatic Browning Inhibition [J]. Journal of Complementary & Integrative Medicine, 2017, 14(1) : 1-13.
- [22] JENKINS N C, GROSSMAN D. Role of Melanin in Melanocyte Dysregulation of Reactive Oxygen Species [J]. BioMed Research International, 2013, 2013(1): 908797.
- [23] MARUSEK C M, TROBAUGH N M, FLURKEY W H, et al. Comparative Analysis of Polyphenol Oxidase from Plant and Fungal Species [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2006, 100(1): 108-123.
- [24] 王兆丰, 代华, 高义霞, 等. 多酚处理对甜樱桃采后品质和活性氧代谢的影响 [J]. 南方农业学报, 2024, 55(2): 578-588.
- [25] CUNHA E S, KAWAHARA R, KADOWAKI M K, et al. Melanogenesis Stimulation in B16-F10 Melanoma Cells Induces Cell Cycle Alterations, Increased ROS Levels and a Differential Expression of Proteins as Revealed by Proteomic Analysis [J]. Experimental Cell Research, 2012, 318(15): 1913-1925.
- [26] GLAGOLEVA A Y, SHOEVA O Y, KHLESTKINA E K. Melanin Pigment in Plants: Current Knowledge and Future Perspectives [J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 770.
- [27] BEAN A, SUNNADENIYA R, AKHAVAN N, et al. Gain-of-Function Mutations in Beet DODA2 Identify Key Residues for Betalain Pigment Evolution [J]. New Phytologist, 2018, 219(1): 287-296.
- [28] LIU C, YAMAMOTO K, CHENG T C, et al. Repression of Tyrosine Hydroxylase is Responsible for the Sex-Linked Chocolate Mutation of the Silkworm, *Bombyx mori* [J]. PNAS, 2010, 107(29): 12980-12985.
- [29] HIRUMA K, RIDDIFORD L M. The Molecular Mechanisms of Cuticular Melanization: The Ecdysone Cascade Leading to Dopa Decarboxylase Expression in *Manduca sexta* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 39(4): 245-253.
- [30] ITO K, KATSUMA S, YAMAMOTO K, et al. Yellow-E Determines the Color Pattern of Larval Head and Tail Spots of the Silkworm *Bombyx mori* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(8): 5624-5629.
- [31] WANG J Q, WANG Y J, LI Y X, et al. L-Arginine Treatment Maintains Postharvest Quality in Blueberry Fruit by Enhancing Antioxidant Capacity during Storage [J]. Journal of Food Science, 2023, 88(9): 3666-3680.
- [32] 李芊萱, 曾凯芳, 邓丽莉. 外源 L-Arg 处理对蜜橘果实贮藏品质的影响 [J]. 食品科学, 2015, 36(24): 313-318.
- [33] WILLS R B H, LI Y X. Use of Arginine to Inhibit Browning on Fresh Cut Apple and Lettuce [J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 113: 66-68.

